

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE β -GALACTOSIDASES PRODUZIDAS POR FUNGOS ISOLADOS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE β -GALACTOSIDASES PRODUZIDAS POR FUNGOS ISOLADOS DO SEMIÁRIDO NORDESTINO¹

Fernanda Costa Silva Santos², Gildomar Lima Valasques Júnior³

RESUMO

Fungos são microrganismos eucariotos, heterotróficos, e a sua grande maioria é aeróbia obrigatória. Pertencem a um grupo diverso e amplamente disseminado na biosfera, classificados como unicelulares (leveduras), ou multinucleados (fungos filamentosos e cogumelos). Os filamentosos produzem biomoléculas que auxiliam no seu crescimento e que garantem sua existência, tal qual, as enzimas, um grupo notável de proteínas, devido principalmente à sua alta especialização e a extraordinária capacidade de se ligar a outras moléculas e modificá-las quimicamente, isso faz com que extremamente versáteis como ferramentas na biotecnologia branca. A enzima β -galactosidase, que catalisa principalmente a hidrólise da lactose em glicose e galactose, vem sendo amplamente utilizada na indústria de laticínios, para melhorar as características organolépticas e físico-químicas dos produtos, em especial, para os indivíduos que possuem intolerância à lactose. Assim, é importante ampliar a busca de fungos que tenha a capacidade de produção da enzima de interesse, como o *Lentinus tigrinus*, uma espécie filamentosa decompositora de madeira, que possui β -galactosidase intracelularmente. O presente estudo buscou realizar uma caracterização parcial da β -galactosidase produzida por *L. tigrinus*, averiguando alguns aspectos e informações acerca da função, cinética, especificidade e estabilidade da enzima.

PALAVRAS-CHAVE: β -galactosidases; Caracterização parcial; Influência de cátions; *Lentinus tigrinus*; Métodos de extração.

ABSTRACT

Fungi are eukaryotic microorganisms, heterotrophic, with the vast majority being obligate aerobes. They belong to a diverse and widely distributed group in the biosphere, classified as unicellular (yeasts) or multinucleated (filamentous fungi and mushrooms). Filamentous fungi produce biomolecules that assist in their growth and ensure their existence, just like enzymes, a remarkable group of proteins, primarily due to their high specialization and extraordinary ability to bind to other molecules and chemically modify them, making them extremely versatile tools in white biotechnology. The enzyme β -galactosidase, which primarily catalyzes the hydrolysis of lactose into glucose and galactose, has been widely used in the dairy industry to improve the organoleptic and physicochemical characteristics of products, especially for individuals with lactose intolerance. Therefore, it is important to expand the search for fungi that have the capacity to produce the enzyme of interest, such as *Lentinus tigrinus*, a wood-decomposing filamentous species that possesses intracellular β -galactosidase. This study aimed to perform a partial characterization of the β -galactosidase produced by *L.*

¹ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB); Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

² Discente de Bacharelado em Farmácia, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

³ Professor Titular, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

tigrinus, investigating some aspects and information regarding the enzyme's function, kinetics, specificity, and stability.

KEYWORDS: β -galactosidases; Extraction methods; Influence of cations; *Lentinus tigrinus*; Partial characterization.

INTRODUÇÃO

Pertencentes ao domínio *Eukarya* e ao reino *Fungi*, os fungos se tratam de um vasto grupo de organismos amplamente disseminados na biosfera. Estima-se a possibilidade de que devam existir 1,5 milhão de espécies, mas somente cerca de 6,67% possuem descrição e, das espécies conhecidas, apenas aproximadamente 200 são consideradas patogênicas, assim, grande parcela não causa nenhum prejuízo e, chegam a ser benéficas. À vista disso, os fungos são cada vez mais empregues na biotecnologia, ganhando uma crescente popularidade em decorrência de seus subprodutos extremamente versáteis, que passaram a ser utilizados como ferramentas para melhoramento de processos industriais. Tal qual o *Lentinus tigrinus*, um basidiomiceto de composição variada, constituído até de enzimas, um grupo que representa um caso especial de função proteica, que pode acelerar as reações químicas com mais eficiência do que catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Uma das enzimas produzidas pelo *L. tigrinus*, a β -galactosidase, catalisa a hidrólise da lactose em glicose e galactose, é empregue na indústria de laticínios para melhorar as características organolépticas e físico-químicas dos produtos. No entanto, é fundamental compreender as propriedades apresentadas dessas enzimas, já que, suas condições ideais são de suma importância para sua aplicabilidade. Uma vez que, entender seu comportamento fornece informações valiosas sobre a sua estabilidade, além de esclarecer suas particularidades. Ante o exposto, a realização deste estudo se torna relevante por propor caracterização parcial de β -galactosidases obtidas no meio intracelular do fungo filamentosso *Lentinus tigrinus*, averiguando algumas das condições ideais que são cruciais para a estabilidade e efetividade da enzima de interesse.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto científico em questão se trata de uma pesquisa quantitativa experimental, realizada no laboratório de Farmacotécnica, pertencente ao curso de Bacharelado em Farmácia, que está alocado ao Departamento de Ciências e Tecnologias (DCT), da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus de Jequié. O fungo *Lentinus tigrinus* utilizado foi concebido pela Coleção de Cultura de Microrganismo da Bahia (CCMB), da Universidade Estadual de Feira de Santana

(UFES). O microrganismo foi mantido incubado em Ágar Batata Dextrose (BDA) sob uma temperatura de 4°C até o início dos experimentos. O *Lentinus tigrinus* foi inoculado em meio de cultura sólido e líquido, com adição de 100 µL da solução de esporos do fungo em questão, e incubado ao longo de até 7 dias sob uma temperatura de 27°C (BOD SL200/90 Incubadora-SOLAB), para ativação do microrganismo. Dentre os experimentos realizados estão: *extração enzimática* (por ruptura em agitador tipo vórtex com pérolas de vidro, com Lauril Sulfato de Sódio, com Triton X-100); *parâmetros cinéticos enzimáticos* (K_m e $V_{máx}$); *otimização de produção segundo Planejamento Doehlert* (tempo de incubação X concentração do indutor lactose); *influência de sais* (Cloreto de Sódio, Cloreto de Potássio, Cloreto de Cálcio, Cloreto Férrico, e Cloreto de Amônio). Em todos os experimentos mencionados, foi realizado a determinação de atividade enzimática da β -galactosidase por meio da absorbância do o-nitrofenol (ONP) em espectrofotômetro UV-Vis Spectroquant Pharo 100 em 410 nm, um subproduto do o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) liberado pela reação. Os dados foram coletados, inseridos e tabulados com o apoio da planilha do Microsoft Excel® versão de 2019, para a geração de tabelas e gráficos, na qual foram submetidos a análises estatísticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo e a caracterização da β -galactosidase são cruciais para otimizar seu uso em bioprocessos. A produzida por o *Lentinus tigrinus* é intracelular, por isso que, quando as células são lesadas, suas concentrações plasmáticas tornam-se elevadas, fazendo com que a extração seja um elemento crítico. Dentre os métodos testados (Tabela 1), o mais eficaz foi o procedimento de ruptura em agitador tipo vórtex com pérolas de vidro, tanto os valores de atividade enzimática (0,123 µmol/min), quanto de atividade específica (4,299 µmol x mg/min) foram os mais expressivos. Enquanto as outras metodologias, chegaram a apresentar a uma boa concentração de proteína total, mas possivelmente grande parte delas não são de nosso interesse.

TABELA 1: Diferentes métodos de extração β -galactosidase intracelular do *L. tigrinus*.

MÉTODO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (µmol/min)	ATIVIDADE ESPECÍFICA (µmol x mg/min)
Vórtex com pérolas de vidro	0,123244838	4,299923446
Lauril sulfato de sódio (1%)	0,009233038	0,367175485
Triton X-100 (1%)	0,012330383	1,345467854

FONTE: Autores (2023).

Em relação a análise de parâmetros cinéticos, apesar dos dados se apresentarem promissores, as representações gráficas ficaram inexatas (Curva de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk), concomitante com o valor do coeficiente de Pearson (R_2) de aproximadamente 0,200, significando uma correlação positiva muito fraca, não sendo possível determinar K_m e $V_{máx}$. Assim como na otimização de produção segundo Planejamento Doehlert, já que as culturas fúngicas são inerentemente variáveis e, mesmo sob condições controladas e padronizadas, os resultados obtidos foram desfavoráveis. Já na influência de cátions (Tabela 2), é perceptível que a presença de solução salina influencia na ligação da enzima com o substrato, seja de maneira profícua ou não. Houve decréscimo na atividade em todas concentrações de NaCl e KCl testadas, sendo que o menor valor registrado de redução de atividade foi KCl em 0,01M. O CaCl₂ e FeCl₃ proporcionaram a melhora da atividade apenas na concentração de 0,05M. E o NH₄Cl, potencializou a atividade enzimática a partir da concentração de 0,02M.

TABELA 2: Atividade enzimática da β -galactosidase de *L. tigrinus* com a variação da concentração das soluções salinas.

CONCENTRAÇÃO	SAL					
	NaCl	KCl	CaCl ₂	NH ₄ Cl	FeCl ₃	Sem sal
0,01 M	0,06719764	0,042713864	0,057168142	0,073687316	0,061740413	
0,02 M	0,067640118	0,057610619	0,061297935	0,081651917	0,071327434	0,080176991
0,03 M	0,067492625	0,062625369	0,079734513	0,089026549	0,068525074	(amostra- controle, sem nenhuma solução)
0,04 M	0,067640118	0,065427729	0,07899705	0,092861357	0,076637168	
0,05 M	0,072064897	0,06380531	0,09020649	0,091828909	0,086961652	

FONTE: Autores (2023).

CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Hodiernamente, a compreensão de enzimas e suas características são extremamente necessários para uma ampla gama de tópicos biotecnológicos, portanto, os resultados obtidos neste trabalho fornecem úteis direcionamento metodológicos. Constatando que a ruptura em agitador tipo vórtex com pérolas de vidro é efetiva para extração de β -galactosidase proveniente de *L. tigrinus*. Ainda foi possível verificar de maneira profícua a influência de cátions na atividade enzimática, caracterizando o cloreto de amônio como um composto potencialmente favorável ao melhoramento da atividade enzimática da enzima em questão. Tal fenômeno pode ter acontecido por diversos fatores, o que representa um ponto de partida para investigações futuras nesse

sentido. Lamentavelmente, não foi possível otimizar a produção e cultivo do fungo de *L. tigrinus*, nem averiguar alguns parâmetros da cinética enzimática das β -galactosidases provenientes do mesmo fungo. Pois, mesmo sob condições controladas, as culturas fúngicas são substancialmente oscilantes, é de sua natureza que dentro da população utilizada para inoculação haja diversidade genética, refletindo no próprio crescimento e na produção de enzimas. Dessa forma, embora nem todos os objetivos tenham sido plenamente atingidos, os conhecimentos obtidos ao longo deste estudo contribuem para a compreensão parcial das β -galactosidases obtidas do fungo filamentoso *Lentinus tigrinus* isolado do semiárido nordestino e, apesar das adversidades encontradas, conseguimos avanços importantes, e os resultados obtidos podem servir como base para pesquisas e estudos futuros, abrindo caminho para pesquisas adicionais que podem levar a avanços mais significativos na biotecnologia e na bioquímica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BANERJEE, G. *et al.* Chemical extraction and optimization of intracellular β -galactosidase production from the bacterium *Arthrobacter oxydans* using Box-Behnken design of response surface methodology. **Acta alimentaria**, v. 45, p. 93-103, 2016.
- 2 BIANCO, L.; PERROTTA, G. Methodologies and perspectives of proteomics applied to filamentous fungi: from sample preparation to secretome analysis. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 3, p. 5803-5829, 2015.
- 3 BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- 4 DOEHLERT, D. H. Uniform Shell Designs. **Journal Of The Royal Statistical Society**, Londres, v. 19, n. 3, p. 231- 239, 1970.
- 5 GOMPERTZ, O. F. *et al.* Micologia Geral. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 6. ed. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2015.
- 6 HUSAIN, Q. β -galactosidases and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 41-62, 2010.
- 7 INANAN, T. Cryogel disks for lactase immobilization and lactose-free milk production. **Food Science and Technology**, v. 154, 2022.
- 8 MADIGAN, M. T. *et al.* Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2016.
- 9 MEDEIROS, F. O. D., ALVES, F. G., LISBOA, C. R., MARTINS, D. D. S., BURKERT, C. A. V., & KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: Um novo método de extração de beta-galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

- 10 NELSON, D. L.; MICHAEL, M. C. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: **Artmed**, 2014.
- 11 SEVINDIK, M. Investigation of Antioxidant/Oxidant Status and Antimicrobial Activities of *Lentinus tigrinus*. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, vol. 2018, 2018.
- 12 TERÇARIOLI, G. R. *et al.* O incrível mundo dos fungos. 1. ed. São Paulo: **Editora UNESP**, 2010.
- 13 ZAMAN, U.; REHMAN, K. U.; KHAN, S. U.; REFAT, M. S.; BADSHAH, S.; HAJIRA, B. IQBAL, A.; KHAN, W. U.; ALSUHAIBANI, A. M. Identification, kinetics and thermodynamic analysis of novel β -galactosidase from *Convolvulus arvensis* seeds: An efficient agent for delactosed milk activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 220, p. 1545-1555, 2022.